

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/CU05/000002

International filing date: 18 March 2005 (18.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

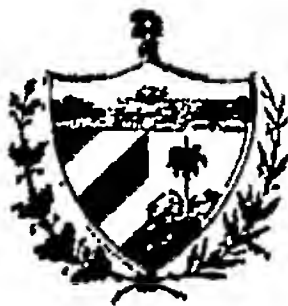
Document details: Country/Office: CU  
Number: 2004-0051  
Filing date: 18 March 2004 (18.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 22 April 2005 (22.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



PCI/CU05/00002

## REPÚBLICA DE CUBA



Msc. Emilia Lara Díaz, Vicedirectora General de la **OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL**.

**CERTIFICO:** Que bajo el número cincuenta y uno del año dos mil cuatro del Registro de Entrada, fue presentada en esta **OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL** la solicitud de Certificado de Patente de Invención, por **COMPOSICIONES VACUNALES OBTENIDAS A PARTIR DE STREPTOMYCES**, con fecha dieciocho de marzo de dos mil cuatro, a las diez horas ante meridiano, por Sucet Beoto Ramos, Representante, ciudadana cubana, a nombre y en representación del INSTITUTO FINLAY, CENTRO DE INVESTIGACIÓN-PRODUCCIÓN DE VACUNAS Y SUEROS, cuya invención fue creada por María Elena Sarmiento García San Miguel, Armando Acosta Domínguez, Carlos Román Vallín Plous, Nesty Olivares Arzuaga, Yamilé López Hernández, Caridad Rodríguez Valdés, Máximo Martínez Benítez, Juan Francisco Infante Bouzac, Astrid Ramos Morí y Leonora González Mesa.

**ASIMISMO CERTIFICO:** Que la mencionada solicitud de Certificado de Patente de Invención, se encuentra actualmente en tramitación.

**TAMBIÉN CERTIFICO:** Que el Resumen, la Memoria Descriptiva, las Reivindicaciones y los Dibujos que se acompañan, son exactamente iguales a las que obran en el expediente.

Y a petición de Sucet Beoto Ramos, Msc y Representante de la Propiedad Industrial, se expide la presente en la Ciudad de La Habana, República de Cuba, a los doce días del mes de abril de dos mil cinco.

Msc. Emilia Lara Díaz  
Vicedirectora General  
Oficina Cubana de la Propiedad Industrial

## COMPOSICIONES VACUNALES OBTENIDAS A PARTIR DE STREPTOMYCES.

### Resumen.

5 La presente invención se relaciona con el campo de la inmunología,  
específicamente con el control de enfermedades infecciosas causadas por  
micobacterias, basado en el uso de vacunas para la prevención de estas  
enfermedades. Con la presente invención se desarrollaron vacunas basadas en  
el uso de cepas vivas de *Streptomyces* expresando o no antígenos de *M.*  
10 *tuberculosis*, las cuales demostraron su capacidad protectora frente al reto con  
BCG y *M. tuberculosis* después de ser administradas por distintas vías. Forma  
parte de la presente invención el uso de cepas de *Streptomyces* para la  
expresión de antígenos heterólogos de interés vacunal.

15

20

25

## COMPOSICIONES VACUNALES OBTENIDAS A PARTIR DE STREPTOMYCES.

### Memoria Descriptiva.

- 5 La presente invención se relaciona con el campo de la inmunología, específicamente con el control de enfermedades infecciosas causadas por micobacterias, específicamente con el desarrollo de vacunas basadas en el uso de cepas vivas de *Streptomyces* que expresan o no antígenos de *M. tuberculosis*, las cuales demostraron su capacidad protectora frente al reto con
- 10 BCG y *M. tuberculosis* después de ser administradas por distintas vías.

Entre las micobacterias se encuentran patógenos importantes para el hombre y los animales, entre ellas *Mycobacterium tuberculosis* que causa la tuberculosis, *Mycobacterium leprae* el cual es responsable de la lepra, *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium intracelulare* productores de la

15 tuberculosis en pacientes inmunodeprimidos, así como otras micobacterias que con menor frecuencia causan enfermedades en el humano (Somner HM, Good RC. *Mycobacterium*. En: Manual of clinical Microbiology, 4 ed. Washington D.C: An society for Microbiology; 1985. p.216-248., Orme IM. Immunity to mycobacteria. *Current Opinión in Immunology*. 1993; 5: 497-502)

- 20 En el caso de los animales, se destacan *Mycobacterium avium* subsp. pararatuberculosis el cual causa la Enfermedad de Jones en rumiantes y *Mycobacterium bovis*, que causa la tuberculosis del ganado vacuno (Dannenberg Am. Patogenesis of tuberculosis: native and acquired resistance in animals and humans. In Leive L, Schelesinger D (eds). *Mycrobiology*. 1984, p344-354).
- 25

Entre las enfermedades micobacterianas más importantes en el hombre se encuentra la tuberculosis (TB) que constituye un problema de salud en todo el mundo y es la primera causa de muerte asociada a enfermedades infecciosas, a pesar de la vacunación con BCG y del uso de un gran número de drogas para

su control (Dolin PJ, Raviglione MK, Kochi A. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. *Bull Who.* 2001; 72: 213).

Se estima que la tercera parte de la población mundial ha sido infectada por el *Mycobacterium tuberculosis*. Cada año 8 millones de personas en todo el mundo desarrollan la TB activa y mueren 3 millones. La coinfección con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), representa del 3 al 5% de los casos (Dolin PJ, Raviglione MK, Kochi A. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. *Bull Who.* 1994; 72: 213).

Debido a la gran extensión de la enfermedad se requieren del desarrollo de nuevos y mejores métodos diagnósticos, preparados vacunales y agentes terapéuticos (Collins FM. Tuberculosis: The Return of an Old Enemy. *Critical Reviews in Microbiology.* 1993; 19: 1-16).

En cuanto al tratamiento, este se basa en combinaciones de medicamentos, administrados a relativamente altas dosis, por largos períodos de tiempo y con toxicidad asociada, lo cual dificulta la implementación de los programas de tratamiento controlado (McCarthy M. Experts see progress in fight against tuberculosis *Lancet.* 2002; 359:2005). En este sentido, sería deseable la disminución de los tiempos de tratamiento, favoreciendo de esta forma la aplicación de los programas de control y el cumplimiento del mismo, lo que evitaría el surgimiento de cepas resistentes. La disminución de las dosis de los fármacos empleados sería también un elemento de utilidad que disminuiría la toxicidad del tratamiento.

El surgimiento de cepas con resistencia múltiple a drogas es un problema creciente en la actualidad que demanda el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas para el elevado número de pacientes que las alberga (50 millones) y para el creciente número de casos con estas características que se presentarán en el futuro (McCarthy M, News. Experts see progress in fight against tuberculosis. *Lancet.* 2002; 359:2005; Hopewell PC. Tuberculosis Control: How the world has changed since 1990. *Bull. World Health Org*

2002, 80:427, Freire M, Rosigno G Joining forces to develop weapons against TB: together we must. Bull. World Health Org 2002, 80:429 ).

Adicionalmente, existen múltiples especies de micobacteria que producen enfermedad en el hombre para las que no se cuenta con un tratamiento  
5 adecuado.

El BCG es la única vacuna antituberculosa existente actualmente para uso humano. En el mundo han sido administradas alrededor de tres billones de dosis. Su eficacia varía ampliamente dependiendo de la cepa empleada, el estado nutricional, fondo genético, envejecimiento y presencia de infecciones  
10 intercurrentes. Se considera que su uso solo es eficaz en la prevención de las formas graves de la enfermedad (miliar y meníngea) en la infancia y que no tiene valor para la prevención de la tuberculosis pulmonar, por lo que es muy urgente la necesidad de desarrollar nuevos preparados vacunales (Hirsch LS, Johnson-JL, Ellner JJ. Pulmonary tuberculosis. Curr-Opin-Pulm-  
15 Med1999;5(3):143-50; Jacobs GG, Johnson JL, Wallis RS. Tuberculosis vaccines: how close to human testing. Tuber Lung Dis 1997;78:159-169; Ginsberg AM. What's new in tuberculosis vaccines? Bull. World Health Org 2002, 80:483).

Las estrategias mas importantes de desarrollo de vacunas contra la  
20 tuberculosis incluyen el uso de cepas inactivadas, cepas atenuadas genéticamente o no, vacunas de ácidos nucleicos, vacunas de subunidades y cepas vivas atenuadas expresando antígenos de *M. tuberculosis*.

Las vacunas inactivadas tienen como desventaja el hecho de que por tratarse de microorganismos muertos, estos tienen una capacidad protectora  
25 disminuida, debido fundamentalmente por la imposibilidad de persistir "in vivo" y la falta de expresión de proteínas relevantes para la protección como son las proteínas de secreción.

En el caso de las cepas atenuadas genéticamente o no, su principal desventaja es la posibilidad de reversión a la virulencia después de administradas, lo cual  
30 genera preocupaciones desde el punto de vista de su seguridad en humanos.



Las vacunas de ácidos nucleicos, a pesar de constituir una estrategia promisorio, hasta el momento en general en humanos no han logrado niveles de inmunogenicidad adecuados.

5 En cuanto a las vacunas de subunidades, por tratarse de componentes purificados a partir del microorganismo u obtenidos por vía recombinante, se plantea que no poseen el mismo potencial de inmunogenicidad que los microorganismos vivos, lo cual dificulta el logro de respuestas protectoras, fundamentalmente en lo referido a la estimulación de respuestas celulares de tipo de células T Auxiliadoras tipo 1 (TH 1).

10 La estrategia de expresión de antígenos de interés vacunal en cepas vivas atenuadas es una de las estrategias más prometedoras en el campo del desarrollo de vacunas de nueva generación contra la tuberculosis, sin embargo, hasta el momento no se han llevado ensayos clínicos con esta variante. Un elemento de importancia de esta estrategia radica en la selección del vector de  
15 expresión, que en dependencia de la cepa seleccionada podría implicar complicaciones desde el punto de vista regulatorio similares a las que se confronta con el uso de cepas vivas atenuadas.

Teniendo en cuenta que *Streptomyces* y *M. tuberculosis* pertenecen a la misma clase, que comparten una gran cantidad de genes y antígenos, unido al hecho  
20 de la probada inocuidad de *Streptomyces* para el hombre y la amplia utilización que estas bacterias han tenido en la producción de fármacos para uso humano, así como el amplio desarrollo de métodos de expresión de proteínas heterólogas en este sistema, incluyendo proteínas de *M. tuberculosis*, se diseñó, mediante la presente invención, el desarrollo de vacunas contra la  
25 tuberculosis que emplean como principio activo cepas vivas de *Streptomyces*, las cuales pueden expresar o no antígenos de *M. tuberculosis*, y que son administradas por distintas vías, incluyendo la mucosal.

Las preparaciones vacunales de la presente invención comprenden una variedad de principios activos derivados del microorganismo *Streptomyces*,  
30 entre los que se encuentran:

- Streptomyces (cepa salvaje)
- Streptomyces recombinante que expresa el antígeno Apa de *M. tuberculosis*

5 La cepa salvaje utilizada en la presente invención es una cepa industrial, no patógena, de amplia utilización en la producción de medicamentos para el hombre.

10 Sorprendentemente se observó una marcada inmunogenicidad humoral y celular de las cepas después de su administración por distintas vías. Las respuestas obtenidas se dirigieron contra los antígenos de la cepa utilizada en la inmunización (*Streptomyces*), contra el antígeno de *M. tuberculosis* expresado en la misma (Apa), así como contra otros antígenos de *M. tuberculosis* y BCG (Ejemplo 1), lo cual confirmó la comunidad de antígenos existente entre *Streptomyces* y Micobacteria y la amplia reactividad cruzada de los mismos. Este hecho avaló la posibilidad del uso de estas cepas como  
15 vacunas frente a *M. tuberculosis*.

Otro hecho que avala su uso es su incapacidad para colonizar y para causar lesiones histopatológicas en el hospedero, hechos que reafirman su inocuidad (Ejemplo 2)

20 Estas cepas son aplicables profilácticamente para la prevención de la tuberculosis, quedando demostrado en todas las vías de administración utilizadas, la inducción de un estado de protección frente a *M. tuberculosis* y BCG (Ejemplo 3).

25 Las composiciones de la presente invención produjeron una disminución significativa de los niveles de infección pulmonar con BCG y *M. tuberculosis* en un modelo de infección en ratones (Ejemplo 3).

La presente invención aborda de manera novedosa la prevención de las enfermedades causadas por micobacterias, en particular contra la tuberculosis, a través del empleo de vacunas basadas en cepas de *Streptomyces*. Es de particular novedad el empleo de cepas de *Streptomyces*, aspecto éste no



conocido en modo alguno a partir del estado del arte. Resulta igualmente novedoso que dichas cepas resultaron efectivas tanto por la vía mucosal como parenteral.

5 Resultó significativo que las cepas de *Streptomyces* pueden ser utilizadas como vectores vivos de expresión de antígenos de interés vacunal lo cual no ha sido reportado en el estado del arte abriendo la posibilidad de utilización de estas cepas para la expresión de antígenos no micobacterianos permitiendo su uso para la prevención y tratamiento de enfermedades alérgicas, tumorales, autoinmunes y en la prevención del embarazo.

10 La presente invención será descrita a través de los siguientes ejemplos específicos.

#### Ejemplo 1. Estudio de Inmunogenicidad

##### **Animales:**

15 Ratones Balb/c machos de 8-10 semanas suministrados por el CENPALAB, Cuba, fueron usados en los experimento.

##### **BCG**

Cepa viva liofilizada de BCG (InterVax, Biological Limited, Canada).

##### ***Streptomyces lividans***

20 Cepa 1326, no transformada genéticamente (*Streptomyces*) y transformada expresando la proteína ApA de *Mycobacterium tuberculosis* (*Streptomyces-ApA*).

##### **Esquema de Inmunización**

40 ratones Balb/c fueron divididos en 4 grupos de 10 animales cada uno (Tabla 1).

25 El Grupo 1 recibió Solución Salina (SS) y fue usado como control.

Los animales de los grupos 2 y 3 recibieron  $10^5$  CFU de *Streptomyces* por la vía intraperitoneal (IP) con un intervalo de 3 semanas entre las dosis. Los animales del grupo 3 recibieron *Streptomyces-ApA* con el mismo esquema.

30 Los animales del grupo 4 se inmunizaron con el mismo protocolo pero utilizando  $10^5$  CFU de BCG en cada inmunización.

21 días después de la última inmunización se tomaron muestras de sangre de cada animal.

**Tabla 1: Estudio de inmunogenicidad**

<u>GRUPO</u>	<u>VIA</u>	<u>INOCULO</u>	<u>N</u>
1	IP	SS 200 µL	10
2		<i>Streptomyces</i> 10 <sup>5</sup> CFU	10
3		<i>Streptomyces-ApA</i> 10 <sup>5</sup> CFU	10
4		BCG 10 <sup>5</sup> CFU	10

5

### Western Blot

Extractos proteicos de *Streptomyces*, BCG y la proteína recombinante ApA de *M. tuberculosis* se separaron por SDS-PAGE (Laemmli A, UK. Nature 1970; 227(6): 680-685) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm usando un sistema semiseco (NovaBlot II, Pharmacia, Sweeden).

10

Las membranas se bloquearon con seroalbúmina bovina (BSA) 2% en PBS durante 2 horas a 37°C, fueron lavadas e incubadas por 1 hora a 37 °C e incubadas con pooles de suero de los animales de los diferentes grupos diluidos 1:150 en PBS.

15

Después del lavado las membranas se incubaron durante 1 hora a 37 grados centígrados con un conjugado polivalente anti inmunoglobulinas de ratón (Sigma), diluido 1:1500 y reveladas con Diaminobenzidine y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato.

El resultado obtenido del estudio de inmunogenicidad demostró la inducción de anticuerpos específicos contra los antígenos de *Streptomyces* en los animales inmunizados con el microorganismo. (**Figura 1**).

Adicionalmente, los animales inmunizados reconocieron proteínas de BCG, demostrando la reactividad cruzada con micobacterias de la respuesta producida. (**Figura 1**).

Este resultado es altamente relevante, ya que demuestra el potencial inmunizante de *Streptomyces* contra las micobacterias.

La reactividad cruzada contra *Streptomyces* producida después de la inmunización con BCG también fue demostrada (**Figure 2**).

El suero de los animales inmunizados con SS no fueron reactivos frente a antígenos de *Streptomyces* o BCG (**Figura 3**).

El grupo de animales inmunizados con *Streptomyces*-ApA mostraron un similar patrón de respuesta que los animales inmunizados con *Streptomyces* (resultados no mostrados). En este grupo de animales, el reconocimiento de la proteína ApA se demostró por Western Blot (resultado no mostrado).

Este resultado demuestra la capacidad de *Streptomyces* de ser usado como un vector vivo para la expresión de antígenos heterólogos, en particular de *M. tuberculosis*.

## 20 Ejemplo 2. Estudio de biodistribución

### **Animales:**

Ratones Balb/c machos de 8-10 semanas suministrados por el CENPALAB, Cuba, fueron usados en los experimento.

### **BCG**

25 Cepa viva liofilizada de BCG (InterVax, Biological Limited, Canada).

### ***Streptomyces lividans***

Cepa 1326, no transformada genéticamente (*Streptomyces*) y transformada expresando la proteína ApA de *Mycobacterium tuberculosis* (*Streptomyces-ApA*).

El estudio se llevo a cabo con 48 ratones, distribuidos en 8 grupos de 6 animales (Tabla 2)

Los animales del grupo 1 recibieron 200µl de SS IP y los animales del grupo 5 recibieron 50 µl SS IN.

- 5 Los animales de los grupos 2, 3, y 4 recibieron *Streptomyces* en dosis de  $10^5$ ,  $10^3$  y  $10^2$  respectivamente en 200 µl de agua destilada (IP).

Los animales de los grupos 6, 7 and 8 recibieron *Streptomyces* en dosis de  $10^3$ ,  $10^2$  y  $10^1$  respectivamente en 50 µl de agua destilada por la vía intranasal (IN).

- Después de 30 días los animales fueron sacrificados y el corazón, pulmón,  
10 hígado, bazo y riñón fueron estudiados histopatológicamente (3 animales) y microbiológicamente (3 animales).

El estudio histopatológico fue realizado mediante tinción con Hematoxilina y Eosina.

- El estudio microbiológico se efectuó utilizando medio YEME (Tobias Kieser,  
15 Mervyn J. Viv., Mark J. Buttner, Perth F. Charter, David A. Hopwood. Practical *Sytreptomyces* Genetics. Crowes, Norwich. England. 2000).

**Tabla 2: Estudio de biodistribucion de *Streptomyces***

<u>GRUPO</u>	<u>VIA</u>	<u>DOSIS</u>	<u>ORGANOS</u>
1	<u>IP</u>	SSF 200 µL	Corazón Pulmón Hígado Bazo Riñón
2		$10^5$ CFU	
4		$10^3$ CFU	
4		$10^2$ CFU	
5	<u>IN</u>	SSF 50 µL	
6		$10^3$ CFU	
7		$10^2$ CFU	
8		$10^1$ CFU	

En el estudio de biodistribución el microorganismo no fue evidente en los órganos estudiados.

El estudio histopatológico no demostró lesiones en los órganos estudiados. Resultados similares se obtuvieron con *Streptomyces-ApA* (resultado no  
5 mostrado).

Tomando en consideración estos estudios, podemos concluir que *Streptomyces* es seguro, demostrándose la posibilidad de su uso como vacuna viva sin efectos adversos.

Debe destacarse que además de seguras estas cepas inducen una adecuada  
10 respuesta inmune (**Figura 1**).

### Ejemplo 3. Experimentos de reto

#### **Animales:**

Ratones Balb/c machos de 8-10 semanas suministrados por el CENPALAB, Cuba, fueron usados en los experimento.

#### **15 BCG**

Cepa viva liofilizada de BCG (InterVax, Biological Limited, Canada).

#### ***Streptomyces lividans***

Cepa 1326, no transformada genéticamente (*Streptomyces*) y transformada expresando la proteína ApA de *Mycobacterium tuberculosis* (*Streptomyces-  
20 ApA*).

Fueron estudiados 26 animales distribuidos en 3 grupos (Tabla 3).

Los animales fueron inmunizados IP en 3 oportunidades con intervalos de 2 semanas.

El Grupo 1 con SS, el Grupo 2 con  $10^5$  CFU de *Streptomyces* y el Grupo 3 con  
25  $10^5$  CFU de BCG.

3 semanas después de la última inmunización los animales fueron retados con  $0.5 \times 10^6$  CFU de BCG IN. 24 horas después los animales fueron sacrificados y los pulmones extraídos para estudios microbiológicos.

#### **Estudios microbiológicos.**

Los macerados de pulmón fueron sembrados en Medio Ogawa (Manual de la OXID. Cuarta Edición. 1981 Editado por OXID Limited, England) e incubados por 28 días a 37°C. Después del periodo de incubación, las CFU fueron contadas y el número de CFU/mg de tejido determinadas.

##### 5 Procesamiento estadístico

La comparación estadística entre los grupos se hizo con el método de Kruskal-Wallis y la prueba de Comparaciones Múltiples de distribución libre.

**Tabla 3: Experimento de Reto**

<u>GRUPO</u>	<u>Inoculación</u>	<u>Día del Reto</u>	<u>N</u>
	0, 21 y 42 días	63	
1	SS 200 µL	BCG 0,5 x 10 <sup>6</sup> CFU	8
2	<i>Streptomyces</i> 10 <sup>5</sup> CFU		10
3	BCG 10 <sup>5</sup> CFU		8

10

En el grupo inmunizado con *Streptomces* hubo una disminución significativa en las CFU de BCG en los pulmones comparados con los grupos inmunizados con BCG y SS (Figura 4). Resultados similares se obtuvieron con el grupo inmunizado con *Streptomyces-ApA* (resultados no mostrados).

15

Los animales inmunizados con *Streptomyces* y *Streptomices-ApA* fueron protegidos frente al reto con *M. tuberculosis* (resultados no mostrados).

Los resultados anteriores demuestran la capacidad protectora de *Streptomyces* contra micobacterias y apoyan su uso como vacunas para la prevención de las infecciones por micobacterias.

20

Ventajas de la solución propuesta.



El uso de este tipo de cepas como vacunas frente a las infecciones por micobacterias en especial frente a la tuberculosis tiene como ventajas el uso de cepas no patógenas lo que permite el uso de las cepas vivas en humanos, lo cual garantiza una adecuada inmunogenicidad y estimulación de las respuestas  
5 inmunes relevantes para la protección.

Otra ventaja de este tipo de cepas es el amplio conocimiento de su genética y el elevado grado de desarrollo de los métodos de transformación genética y de expresión en altos niveles de proteínas heterólogas en estos hospederos entre las que se incluyen las de *M. tuberculosis* lo que permite el desarrollo de cepas  
10 de *Streptomyces* expresando altos niveles de proteínas de *M. tuberculosis*, de preferencia en forma secretada lo que garantiza una elevada inmunogenicidad y capacidad protectora.

Otra de las ventajas radica en la amplia experiencia que existe con el uso industrial de estas cepas para la producción de medicamentos de uso humano  
15 lo que garantiza la producción industrial de estas vacunas.

En el caso particular de infecciones por micobacterias la demostración de la capacidad protectora de la administración por vía de mucosas asegura la inducción de respuestas protectoras a nivel de la puerta de entrada del microorganismo. La vía de administración mucosal asegura una vía fácil y  
20 versátil de aplicación en el sitio de entrada de estos microorganismos, favoreciendo el bloqueo de la infección y por lo tanto el efecto profiláctico.

Otra de las ventajas es el amplio espectro de actividad contra distintos tipos de micobacteria demostrado por la protección inducida frente a *M. tuberculosis* y BCG, lo que garantiza su uso para la prevención de un amplio espectro de  
25 enfermedades por micobacterias.

También las cepas de *Streptomyces* transformadas genéticamente y expresando antígenos de interés vacunal no micobacterianos pueden ser utilizadas para la profilaxis o terapéutica de enfermedades infecciosas no micobacterianas, autoinmunes, alérgicas, tumorales, así como la prevención  
30 del embarazo.

Breve descripción de las figuras.

**Figura 1:** Western blot. Tiras de Nitrocelulosa con extractos de Streptomyces (1) y BCG (2) fueron estudiados frente a un pool de sueros de animales inmunizados con Streptomyces (Grupo 2)

5 **Figura 2:** Western blot. Tiras de Nitrocelulosa con extractos de BCG (1) y Streptomyces (2) fueron estudiados frente a un pool de sueros de animales inmunizados con BCG (Grupo 3)

**Figure 3:** Western blot. Tiras de Nitrocelulosa con extractos de BCG (1) y Streptomyces (2) fueron estudiados frente a un pool de sueros de animales  
10 inmunizados con Solución Salina (Grupo 1)

**Figure 4:** Experimento de reto con BCG. Los valores representan el logaritmo medio de las CFU/mg de tejido pulmonar. Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo inmunizado con Streptomyces y los grupos inmunizados con BCG y Solución Salina (SS).

15

20

## COMPOSICIONES VACUNALES OBTENIDAS A PARTIR DE STREPTOMYCES.

### REIVINDICACIONES

- 5
1. Composiciones vacunales obtenidas a partir Streptomyces caracterizadas porque comprenden como principio activo una o más cepas salvajes del género Streptomyces o cepas mutantes o recombinantes derivadas de las mismas, así como un excipiente apropiado.
  - 10 2. Composición vacunal según la reivindicación 1 caracterizada porque dichas cepas de Streptomyces son cepas vivas.
  3. Composición vacunal según las reivindicaciones 1 y 2 caracterizada porque dichas cepas de Streptomyces son *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor* y *Streptomyces Sp.*
  - 15 4. Composición vacunal según la reivindicación 1 caracterizada porque dichas cepas recombinantes de Streptomyces expresan uno o más antígenos heterólogos de interés vacunal.
  5. Composición vacunal según la reivindicación 4 caracterizada porque dichas cepas recombinantes de Streptomyces expresan uno o más
  - 20 antígenos de *Mycobacterium. tuberculosis*
  6. Uso de la composición vacunal de las reivindicaciones de la 1 a la 5 para la prevención o terapéutica de enfermedades infecciosas.
  7. Uso según la reivindicación 6 para la prevención o terapéutica de infecciones causadas por micobacterias.
  - 25 8. Uso según la reivindicación 7 para la prevención o terapéutica de la tuberculosis.
  9. Uso de la composición vacunal de las reivindicaciones de la 1 a la 5 para la prevención o terapéutica de enfermedades tumorales.

10. Uso de la composición vacunal de las reivindicaciones de la 1 a la 5 para la prevención o terapéutica de enfermedades autoinmunes.
11. Uso de la composición vacunal de las reivindicaciones de la 1 a la 5 para la prevención o terapéutica de enfermedades alérgicas.
- 5 12. Uso de la composición vacunal de las reivindicaciones de la 1 a la 5 para la prevención del embarazo

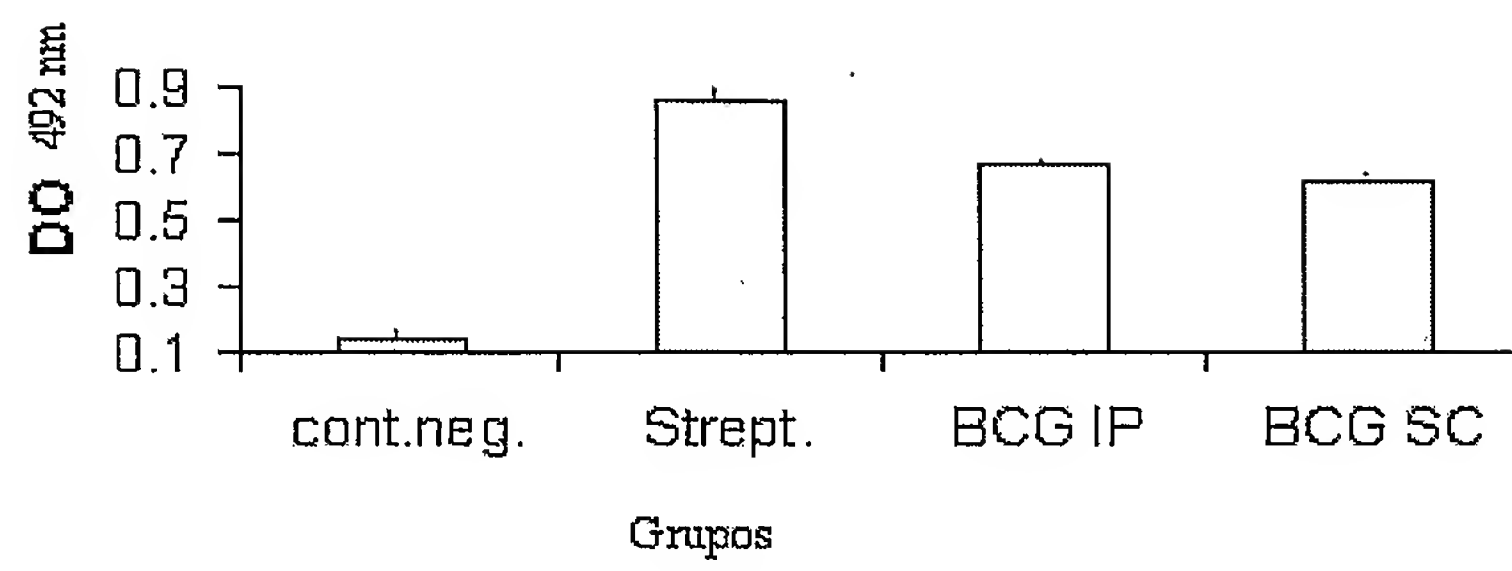
10

15

20

25

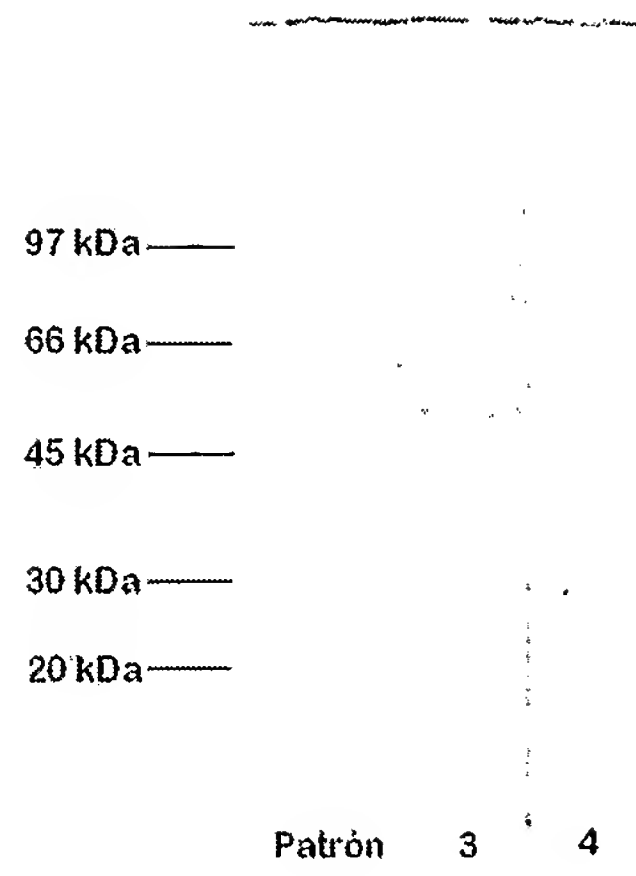
Figuras.1



5

10

Figura 2



5

10



Figure 3

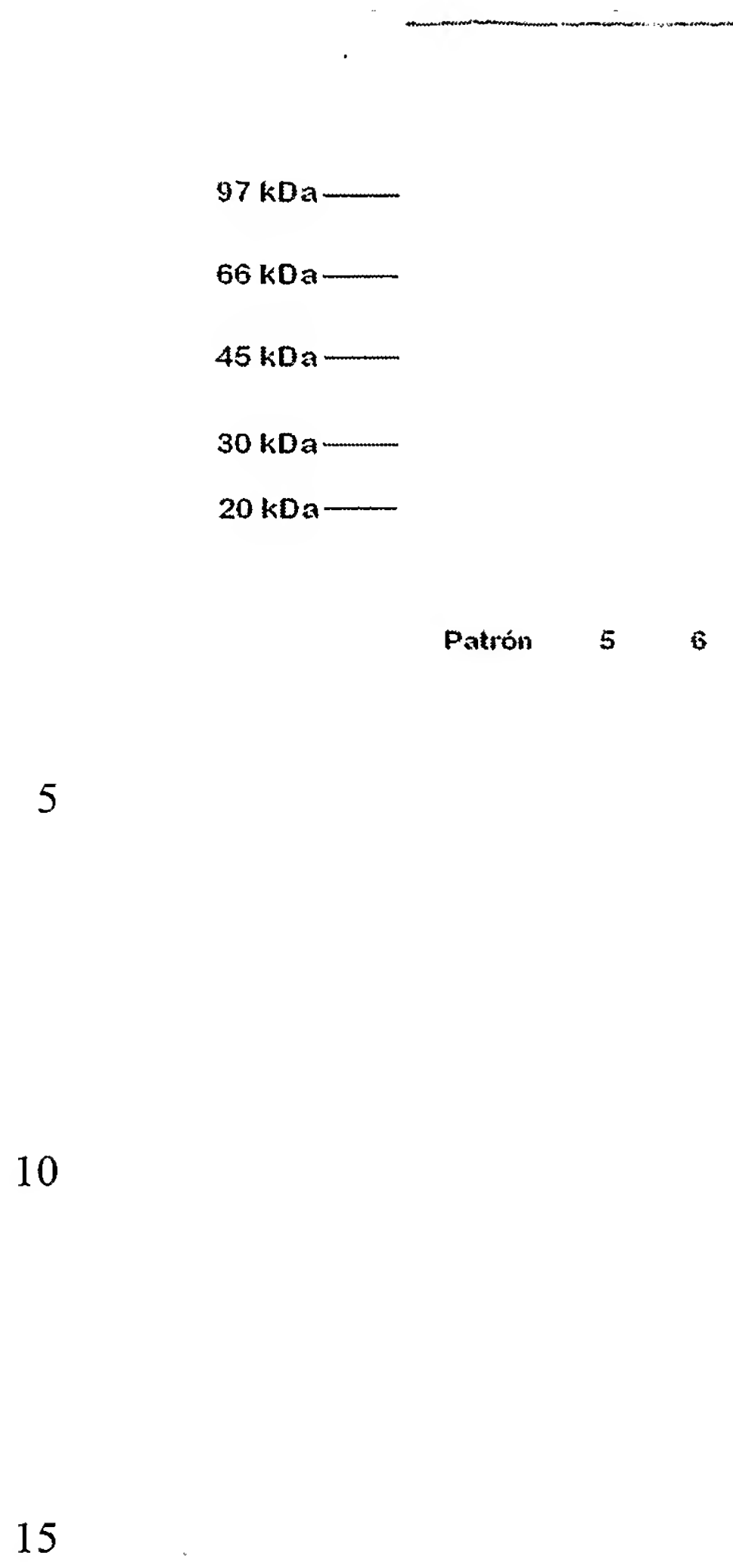
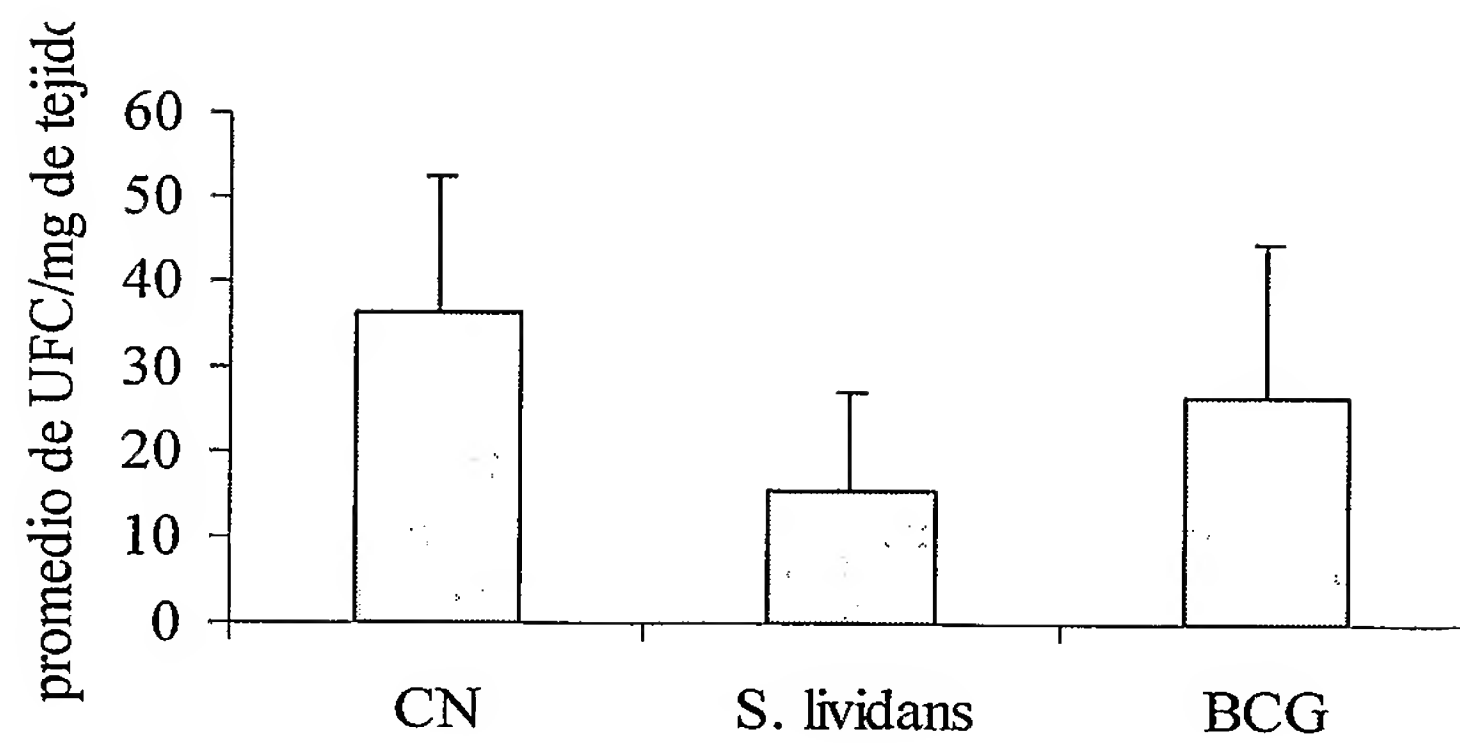


Figure 4



5

10